



FR 99/1827

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

REC'D 20 DEC 1999

WIPO

PCT

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 DEC. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

**SIEGE**

26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **18 NOV 1998**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **98 14470 -**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**  
DATE DE DÉPÔT **18 NOV. 1998**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET ORES**  
**6, avenue de Messine**  
**75008 PARIS**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire  
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant  
**MJPCb539/79FR**

téléphone

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**GENE CODANT POUR UNE ACYLTRANSFERASE DE COLZA, ET SES UTILISATIONS**

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA**

Forme juridique

**Etablissement public**

Nationalité (s) **française**

Adresse (s) complète (s)

**147, rue de l'Université**  
**75338 PARIS CEDEX 07**

Pays

**FRANCE**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Marie-José VIALLE-PRESLES (N° 93-2009)

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

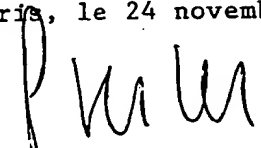
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		MJPcb539/79FR	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		9814470	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) GENE CODANT POUR UNE ACYLTRANSFERASE DE COLZA, ET SES UTILISATIONS			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		RENARD	
<b>Prénoms</b>		Michel	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	9, avenue du Stade	
	<b>Code postal et ville</b>	35650	LE RHEU
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		ROSCOE	
<b>Prénoms</b>		Thomas, James	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	2, rue Resseguier	
	<b>Code postal et ville</b>	66200	ALENYA
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		DELSENY	
<b>Prénoms</b>		Michel	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	10, rue Jean Jaurès	
	<b>Code postal et ville</b>	66430	BOMPA
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 24 novembre 1999  VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)	

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08


Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		MJPCb539/79FR	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		9814470	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) GENE CODANT POUR UNE ACYLTRANSFERASE DE COLZA, ET SES UTILISATIONS			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		BOURGIS	
<b>Prénoms</b>		Fabienne	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	Laboratoire de Physiologie et Biologie Moléculaire des Plantes 52, avenue de Villeneuve	
	<b>Code postal et ville</b>	66860	PERPIGNAN CEDEX
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		BARRET	
<b>Prénoms</b>		Pierre	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	99, avenue de la Libération	
	<b>Code postal et ville</b>	63000	CLERMONT-FERRAND
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		GUERCHE	
<b>Prénoms</b>		Philippe	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	7, rue Marceau	
	<b>Code postal et ville</b>	92170	VANVES
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 24 novembre 1999    VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)	

GENE CODANT POUR UNE ACYLTRANSFERASE DE COLZA,  
ET SES UTILISATIONS

L'invention est relative à l'identification et au clonage d'un gène codant pour une acyltransférase, et  
5 à ses utilisations.

Les glycérolipides (glycolipides, phospholipides, et triacylglycérides) constituent chez les végétaux la majeure partie des lipides. Leur précurseur commun est le *sn*-1,2-diacylglycérol-3-phosphate ou acide phosphatidique (PA), résultant de l'estérification des positions  
10 *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol-3-phosphate (G3P) par des acides gras. La *sn*-glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) (E.C 2.3.1.15) catalyse l'acylation de la position *sn*-1 du G3P pour former le *sn*-1-acylglycérol-3-phosphate ou  
15 acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA est ensuite utilisé comme substrat par la 1-acyl-*sn*-glycérol-3-phosphate acyltransférase ou acyltransférase lysophosphatidique (LPAAT) (E.C.2.3.1.51) qui acyle la position *sn*-2 du glycérol. Dans la synthèse des triacylglycérides, qui cons-  
20 tituent l'essentiel des lipides de réserve, intervient une troisième enzyme, la *sn*-1,2-diacylglycérol acyltransférase ou diacylglycérol acyltransférase (DAGAT) qui catalyse l'acylation de la position *sn*-3.

Les lipides végétaux sont utilisés actuellement dans des domaines très variés, de l'alimentation à l'industrie chimique, et il est souhaitable de disposer de plantes produisant des lipides spécifiquement adaptés à l'utilisation envisagée. Dans ce but, on cherche notam-  
25 ment à modifier la composition en acides gras des glycérolipides, et en particulier des triacylglycérides.

Par exemple, dans le cas du colza (*Brassica napus*), on utilise pour l'huile alimentaire, les plantes ayant la teneur la plus faible possible en acide érucique. En revanche, on recherche une teneur élevée en acide érucique chez les plantes produisant des huiles destinées  
35 à l'utilisation industrielle.

La composition des glycérolipides en acides gras dépend essentiellement, d'une part de la répartition quantitative et qualitative des acides gras produits par la plante, et d'autre part de la spécificité de substrat des acyltransférases vis-à-vis de ces acides gras. Pour  
 5 contrôler cette composition, il a été proposé d'agir séparément ou conjointement sur ces deux facteurs, en intervenant :

- au niveau de la biosynthèse des acides gras, pour favoriser ou au contraire inhiber la production d'un ou plusieurs acides gras spécifiques, et éventuellement pour induire la synthèse de nouveaux acides gras ;

- au niveau de l'acylation du G3P, pour modifier sa spécificité dans le sens souhaité.

15 Dans le cas du colza, les variétés les plus riches en acide érucique actuellement disponibles produisent une huile dans laquelle l'acide érucique représente au plus 50 à 60% des acides gras totaux. L'analyse des triacylglycérides des graines issues de ces variétés a  
 20 montré que cet acide est présent quasi exclusivement aux positions *sn*-1 et *sn*-3 ; cette répartition sélective a été attribuée à la spécificité de substrat de la LPAAT de colza, qui exclurait les acides gras à très longue chaîne (>C20) ; ceci limite la teneur en acide érucique des  
 25 triacylglycérides de graines de colza à un seuil théorique maximal de 66% des acides gras totaux.

Dans le but de s'affranchir de cette limitation, le gène d'une LPAAT de *Limnanthes alba* capable d'incorporer l'acide érucique en position *sn*-2 a été exprimé dans les graines d'une variété de colza à taux élevé en acide érucique. Cependant, bien qu'une incorporation d'acide érucique en position *sn*-2 ait effectivement été observée dans les triacylglycérides des graines de ce colza transgénique, cette incorporation est restée faible ; en outre, la quantité totale d'acide érucique incorporée dans ces triacylglycérides n'était pas supé-  
 30  
 35

rieure à celle des plantes témoin non transformées [LASSNER et al., Plant Physiol. 109:1389-1394, (1995)].

5 Ce résultat pourrait s'expliquer, en dehors de l'éventualité d'une production limitante d'acide érucique, par une faible spécificité de la LPPAT exogène de *Limnanthes*, qui, outre l'acide érucique, pourrait également incorporer de l'acide oléique, et également par l'existence d'une compétition entre l'activité LPAAT exogène et une activité LPAAT endogène du colza, qu'il se-  
10 rait nécessaire d'inhiber pour augmenter l'incorporation d'acide érucique.

Jusqu'à présent, on ne disposait que de peu d'informations sur l'enzyme ou les enzymes responsable(s) de l'activité LPAAT chez le colza. Les LPAAT sont en ef-  
15 fet des enzymes membranaires, difficiles à purifier sous forme active.

A l'exception de la LPAAT de noix de coco [KNUTZON et al., Plant Physiol. 109:999-1006, (1995)], qui a été purifiée à partir des membranes de l'albumen,  
20 et dont le gène a été ultérieurement isolé par criblage d'une banque d'ADNc, les LPAAT végétales déjà identifiées ont pour la plupart été caractérisées par des techniques de génétique moléculaire. Il s'agit de la LPAAT de maïs [BROWN et al., Plant Mol. Biol., 26:211-223, (1994)], des  
25 LPAAT de *Limnanthes* [BROWN et al., Plant Mol. Biol., 29:267-278, (1995); HANKE et al., Eur. J. Biochem. 232:806-810, (1995)].

Afin de permettre l'amélioration du contrôle de l'acylation en position sn-2, les Inventeurs ont entrepris de caractériser la ou les enzymes impliquée(s)  
30 dans l'activité LPAAT chez le colza.

Ils sont ainsi parvenus à isoler une séquence d'ADN de *Brassica napus* codant pour une LPAAT plastidiale fonctionnelle ; cette LPAAT sera dénommée ci-après BAT2  
35 (Brassica Acyl-Transférase 2).



Une séquence d'acide nucléique comprenant la séquence codant pour BAT2 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1, et la séquence polypeptidique déduite est représentée sous le  
 5 numéro SEQ ID NO: 2.

2 codons ATG pouvant constituer des sites potentiels d'initiation de la traduction sont présents sur la séquence SEQ ID NO: 1 ; le polypeptide de 344 acides aminés débutant au résidu méthionine en position 16 de la  
 10 séquence SEQ ID NO: 2 est suffisant pour l'activité LPAAT.

L'analyse de la séquence en acides aminés de BAT2 par le logiciel pSORT suggère la présence d'une séquence signal comprise dans les 95 acides aminés N-terminaux de la séquence SEQ ID NO: 2. Cette séquence signal est impliquée dans l'adressage de la LPPAT BAT2 dans la membrane plastidiale.

La séquence de la protéine mature active est comprise dans les 279 acides aminés C-terminaux.

20 La comparaison, à l'aide du logiciel BLASTX2 [GISH et al., Nat. Genet., 31:266-272, (1994)] entre la séquence peptidique de BAT2, et les séquences peptidiques de LPAAT précédemment connues, fait apparaître une très faible homologie (au maximum 20% d'identité) lorsque la  
 25 comparaison est effectuée sur l'ensemble de la séquence.

Sur certaines régions de la séquence, on observe une homologie plus importante. La figure 1 représente l'alignement de la séquence 187-302 de BAT2 avec les séquences des LPAAT présentant la plus forte homologie. Les scores les plus importants sont observés avec :

30 - le produit du gène *SLC1* de *S. cerevisiae* (P33333) [NAGIAC et al. J. Biol. Chem., 268:22145-22163, (1993)] : 32% d'identité et 51% d'équivalence, sur un alignement de 204 acides aminés ;

35 - la LPAAT microsomale des graines de *Limnanthes* (Q42870) [HANKE et al., Eur. J. Biochem., 232:806-810,

(1995) ; LASSNER et al., Plant Physiol. 109:1389-1394,  
 (1995) ; BROWN et al., Plant Mol. Biol., 29:267-  
 278,.(1995)] : 30% d'identité et 54% d'équivalence, sur un  
 alignement de 182 acides aminés ;

5                   - la LPAAT d'endosperme de noix de coco  
 (Q42670) [KNUTZON et al., Plant Physiol. 109:999-1006,  
 (1995)] : 31% d'identité et 47% d'équivalence, sur un  
 alignement de 229 acides aminés ;

10                   - la LPAAT hypothétique de *Synechocystis*,  
 (P74498) : 30% d'identité et 55% d'équivalence, sur un  
 alignement de 143 acides aminés ;

                  - la protéine plsC de *E. Coli* (P26647) : 31%  
 d'identité et 50% d'équivalence, sur un alignement de 115  
 acides aminés.

15                   La présente invention a pour objet un fragment  
 d'acide nucléique comprenant :

                  a) une séquence codant pour une LPAAT végétale  
 dont la séquence peptidique présente au moins 20%, de  
 préférence au moins 30% et avantageusement au moins 50 à  
 20 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO: 2 ; et/ou

                  b) une séquence complémentaire de la séquence  
 codante a) ci-dessus.

                  Selon un mode de réalisation préféré de la  
 présente invention, ladite séquence codante code pour le  
 25 polypeptide de séquence SEQ ID NO: 2.

                  L'invention englobe également des fragments de  
 plus de 20pb, et de préférence de plus de 30pb, d'une sé-  
 quence codante telle que définie ci-dessus, ou capables  
 de s'hybrider spécifiquement en conditions stringentes,  
 30 avec ladite séquence. Ceci inclut en particulier les  
 fragments de toute séquence codant pour le polypeptide  
 SEQ ID NO: 2, ou de sa séquence complémentaire, à  
 l'exception des fragments constitués par un oligonucléo-  
 tide codant pour l'une des séquences peptidiques suivan-  
 35 tes (code 1 lettre) :

FPEGTRS ;

PFKKGA ;

qui sont communes à des LPAATs de séquences antérieurement connues, ou des fragments complémentaires dudit oligonucléotide.

5 Des fragments d'acide nucléique conformes à l'invention peuvent en particulier être utilisés comme amorces et/ou sondes, pour détecter et cloner des séquences codant pour des LPAATs plastidiales, de colza ou d'autres végétaux, ainsi que des séquences codant pour  
10 des LPAATs de colza ou d'autres espèces, notamment de crucifères, exprimées dans des compartiments cellulaires autres que les plastes, en particulier le réticulum endoplasmique.

Les analyses effectuées par transfert de  
15 Southern et par RFLP, en utilisant comme sonde d'hybridation en conditions stringentes l'ADNc de BAT2, marqué au  $^{32}\text{P}$ , montrent la présence dans le génome du colza, ainsi que dans le génome d'*A. thaliana*, d'au moins 2 exemplaires homologues du gène BAT2, et permettent de  
20 supposer que ce gène fait partie d'une famille multigénique comprenant 4 membres.

La présente invention a également pour objet :  
- les vecteurs recombinants résultant de l'insertion d'au moins un fragment d'acide nucléique conforme à l'invention, dans un vecteur approprié ; avantageusement, il s'agit de vecteurs d'expression dans lesquels le fragment d'acide nucléique conforme à l'invention est inséré sous contrôle transcriptionnel de séquences de régulation (telles que promoteur et/ou terminateur) fonctionnelles dans une cellule-hôte dans laquelle  
25 on souhaite exprimer ledit fragment.

- les cellules-hôtes, procaryotes ou eucaryotes, et les organismes pluricellulaires, en particulier des cellules végétales et des végétaux, transformés par  
35 au moins un fragment d'acide nucléique conforme à l'invention.

L'invention englobe également la LPAAT recombinante ou les fragments de LPAAT recombinante, résultant de l'expression dans une cellule-hôte, de la séquence codant pour ladite LPAAT ou ledit fragment, portée par un fragment d'acide nucléique conforme à l'invention. La LPAAT recombinante conforme à l'invention, ou ses fragments, peuvent par exemple être utilisés pour produire des anticorps anti-LPAAT, permettant le criblage de banques d'expression d'ADNc dans le cadre de la détection et du clonage d'autres LPAATs.

Des fragments d'acide nucléique conformes à l'invention peuvent avantageusement être utilisés, en orientation sens ou antisens, pour produire des plantes transgéniques, notamment à partir de colza ou d'autres plantes oléagineuses, afin de réguler l'activité LPAAT chez la plante ainsi transformée, et agir sur la composition en acides gras des lipides, et en particulier des triacylglycérides, produits par cette plante.

La présente invention englobe également les plantes transgéniques produites de la sorte.

Ces plantes peuvent être obtenues par les techniques habituelles, connues en elles-mêmes, de transgénèse végétale. Selon l'utilisation envisagée, une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention peut être placée sous contrôle d'un promoteur inductible ou d'un promoteur constitutif, d'un promoteur ubiquitaire, ou d'un promoteur tissu-spécifique. Ces plantes peuvent également contenir d'autres transgènes, préférentiellement des transgènes dérivés de gènes impliqués dans la biosynthèse des lipides.

On peut en particulier obtenir :

- des plantes transgéniques, exprimant au moins une séquence conforme à l'invention codant pour une LPAAT fonctionnelle, en lieu et place d'une ou plusieurs séquences codant des LPAAT endogènes, ou en supplément de celles-ci ;

- des plantes transgéniques exprimant au moins une séquence conforme à l'invention en orientation anti-sens, afin d'inhiber l'expression des LPAAT endogènes homologues, et favoriser ainsi l'activité d'autres LPAATs, d'origine endogène ou exogène.

Par exemple :

- pour produire des colzas transgéniques à teneur élevée en acide érucique, on peut co-transformer le colza avec d'une part une séquence d'ADN codant pour une LPAAT incorporant préférentiellement l'acide érucique en position *sn*-2, telle que la LPAAT de *Limnanthes alba* [LASSNER et al., (1995), publication précitée], et d'autre part une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention en orientation antisens, afin d'inhiber au moins en partie, la production de LPAAT endogène entrant en compétition avec l'activité de la LPAAT exogène de *Limnanthes* ;

- pour augmenter la teneur globale des graines en triglycérides, on peut transformer le colza avec une séquence d'ADN conforme à l'invention, codant pour une LPAAT plastidiale déléetée de sa séquence d'adressage dans les plastes ;

- pour augmenter la teneur en acides gras saturés, en particulier en acide palmitique, on peut co-transformer le colza avec une séquence d'ADN conforme à l'invention, codant pour une LPAAT plastidiale déléetée de sa séquence d'adressage dans les chloroplastes, et avec un ou plusieurs gènes d'ACP-thioestérases utilisant préférentiellement des palmitoyl-ACP comme substrats.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'identification, et le clonage d'un gène codant pour la LPAAT BAT2 de *Brassica napus*.

# **EXEMPLE 1 : ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE L'ADNc D'UNE LPAAT DE COLZA**

Pour rechercher la présence de gènes codant pour des LPAAT, une banque d'ADNc d'embryons immatures de colza a été criblée par complémentation hétérologue de la mutation du gène *plsC* de la souche JC201 d'*E. Coli* [COLEMAN, J. Biol. Chem., 265:17215-17221, (1990)]. Cette mutation ponctuelle confère aux mutants JC201 un phénotype thermosensible, du fait de l'inactivation à température élevée de la LPAAT codée par le gène *plsC*. Ces mutants poussent bien à 30°C, difficilement à 37°C et pas du tout à 42-44°C.

Pour le criblage, une banque de phagemides dérivée de  $2 \times 10^6$  clones prélevés sur une banque d'ADNc d'embryons immatures de colza clonés dans le vecteur lambda ZAPII (STRATAGÈNE), a été construite en utilisant le kit « ExAssist » (STRATAGÈNE).

Les bactéries sont transformées par électroporation avec ces phagemides, puis cultivées sur LB agar, en présence d'ampicilline et d'IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-galactothiopyranoside). Les bactéries qui poussent à 42°C sont sélectionnées. L'ADN plasmidique des clones capables de pousser à 42°C a été analysé par PCR, pour déterminer la taille de l'insert. Après 3 cycles de transformation suivie de sélection, environ 85% des clones contiennent un insert de 1,2 kb environ. Le séquençage des extrémités des inserts de 4 de ces clones montre qu'ils sont identiques. L'un de ces clones, dénommé pBAT2, a été entièrement séquencé.

## **EXEMPLE 2 : SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE DE BAT2 ET SÉQUENCE PEPTIDIQUE DÉDUITE.**

L'ADNc du clone pBAT2 comprend une séquence de 1155pb suivie d'une queue poly(A) de 18 résidus. Cette séquence comprend une phase unique de lecture ouverte, correspondant à un polypeptide de 351 acides aminés, qui représente une protéine de fusion, comprenant 344 acides

aminés de la séquence de pBAT2, et une partie de la séquence de la  $\beta$ -galactosidase du vecteur de clonage. La séquence qui est représentée sur la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1, comprend en outre une  
5 partie de la séquence génomique (nucléotides 1 à 79 de la séquence SEQ ID NO: 1) située en amont de la séquence d'ADNc de pBAT2.

2 codons ATG pouvant constituer des sites potentiels d'initiation de la traduction ont été localisé  
10 sur la séquence SEQ ID NO: 1 ; si le premier d'entre eux (position 58 de la séquence SEQ ID NO: 1) est utilisé, le produit de traduction de la séquence SEQ ID NO: 1 est un polypeptide de 359 acides aminés, dont le poids moléculaire et le pI théoriques sont respectivement de 39,6  
15 kDa, et d'environ 9,8 ; ce polypeptide est représenté sur la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 2. Si l'initiation de la traduction s'effectue au niveau du 2<sup>ème</sup> codon ATG (position 103 de la séquence SEQ ID NO: 1), le produit de traduction est un polypep-  
20 tide de 344 acides aminés, dont le poids moléculaire théorique est d'environ 37,9 kDa.

L'analyse de la séquence en acides aminés de BAT2 par le logiciel pSORT suggère la présence d'un peptide signal d'environ 80 à 95 résidus. Cette séquence si-  
25 gnal potentielle est riche en sérine, en alanine, en valine, et en acides aminés basiques, ce qui est caractéristique des séquences d'adressage vers la membrane des chloroplastes.

L'analyse de la séquence polypeptidique indique également la présence de deux domaines transmembranaires potentiels, respectivement situés entre les acides aminés 124 à 140, et 219 à 235.

Les séquences consensus des LPAAT (FPEGTRS et PFKKGA), sont respectivement situées aux positions 273-  
35 279 et 286-291 de la séquence SEQ ID NO: 2 ; une séquence correspondant à la séquence consensus NHXXXXD, qui est

conservée chez toutes les acyltransférases membranaires connues jusqu'à présent, est localisée aux positions 202-208 de la séquence SEQ ID NO: 2.

### EXEMPLE 3 : ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA PROTÉINE CODÉE PAR L'INSERT D'ADNC DE pBAT2

Pour vérifier que la protéine codée par l'insert de pBAT2 possédait effectivement une activité LPAAT, la capacité de cette protéine à incorporer l'acide oléique ou de l'acide palmitique en position sn-2 du LPA, a été testée.

La souche *E. coli* JC201 transformée avec pBAT2, et à titre de témoins, la souche *E. coli* JC201 non-transformée, ou transformée avec le vecteur (pBSK) dépourvu de l'insert d'ADNC de BAT2, sont mises en culture à 30°C jusqu'à une densité optique de 0,5.

Après induction par l'IPTG, et culture pendant 3 h à 30°C, les bactéries sont lysées et fractionnées et l'activité spécifique LPAAT est mesurée, sur les extraits membranaires bruts, en présence d'oléoyl-CoA(1-<sup>14</sup>C) ou de palmitoyl-CoA(1-<sup>14</sup>C), selon le protocole de CAO et al. [Plant Physiol., 9:1199-1206, (1990)].

Les résultats sont illustrés par le tableau I ci-dessous, qui indique l'activité spécifique, en pmol d'acide phosphatidique formées/mg de protéine/heure.

TABLEAU I

CULTURE	SUBSTRAT	
	Oléoyl-CoA(1- <sup>14</sup> C)	Palmitoyl-CoA(1- <sup>14</sup> C)
JC201	1,86	3,74
JC201+pBSK	1,65	1,59
JC201+pBAT2	5,8	11,06

Les extraits membranaires de la culture transformée avec pBAT2 présentent une activité LPAAT supérieure à celle des extraits membranaires obtenus à partir de la culture non-transformée, ou transformée avec le vecteur pBSK, ce qui montre que l'activité LPAAT est effectivement restaurée par le produit de traduction de l'insert de pBAT2.



**EXEMPLE 4 : LOCALISATION CELLULAIRE DE BAT2**

La localisation plastidique suggérée par l'analyse de séquence de BAT2 a été vérifiée en testant la capacité de chloroplastes de pois isolés à importer  
 5 BAT2.

Dans ce but, l'ADNc du clone pBAT2 a été transcrit *in vitro*, en utilisant l'ARN polymérase T3 ; le transcrit est traduit en système acellulaire de germe de blé, en présence de méthionine marquée au <sup>35</sup>S. On obtient  
 10 ainsi un produit de traduction d'environ 40 kDa. Ce produit est incubé avec des chloroplastes isolés de pois. Après l'incubation, les chloroplastes sont traités à la protéase et fractionnés, selon le protocole décrit par BROCK et al. [Plant Mol. Biol. 23(4), 717, (1993)], et  
 15 les différentes fractions analysées par électrophorèse pour rechercher le produit marqué au <sup>35</sup>S.

Les résultats de cette analyse montrent que le produit de traduction de BAT2 est importé dans les chloroplastes de pois, et clivé en une protéine de 32 kDa qui  
 20 est essentiellement localisée dans la fraction membranaire, et un peptide signal de 8kDa.

Ces résultats confirment que la protéine BAT2 est bien synthétisée avec un peptide signal dont le rôle est d'importer la protéine dans la membrane des chloroplastes. Le précurseur a une masse apparente d'environ  
 25 40 kDa et le peptide signal d'environ 8 kDa.

**EXEMPLE 5 : LOCALISATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE BAT2**

L'expression du gène BAT2 a été étudiée dans différents organes de *B. napus* et d'*A. thaliana*.

30 L'étude a été effectuée par transfert de Northern, en utilisant une sonde correspondant à la séquence codante de BAT2, sur des ARN totaux de tiges, de racines, de feuilles, de fleurs, de graines en cours de développement [28 JAP (jours après pollinisation)], et de graines  
 35 sèches.

Dans chacun des tissus de *B. napus* et d'*A. thaliana* testés, on observe l'hybridation de la sonde avec un transcrit d'environ 1,3 kb chez *B. napus*, et avec un transcrit d'environ 1 kb chez *A. thaliana*. L'intensité du signal d'hybridation est similaire dans tous les tissus, y compris les tissus non-photosynthétiques contenant des plastides autres que les chloroplastes. L'observation d'une hybridation dans les graines matures, indique en outre que le messenger de BAT2 demeure stable lors de la maturation de la graine.

## LISTE DE SÉQUENCES

NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 1252 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: double
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: CDS
  - (B) EMPLACEMENT: 58..1134

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TAAAAACAGC AGAGAAAAGA GTCAAGAGAT AAAAGCAATG AAGATGGAGA GATAAGC	57
ATG AGC AAA TCT CAC GGA CGA TGT TTT AGC TCG CGA GAT TCC GCC ATG	105
Met Ser Lys Ser His Gly Arg Cys Phe Ser Ser Arg Asp Ser Ala Met	
1 5 10 15	
GAT GTC GCT TCT GCT CGG GGG GTC TCC TCA CAT CCT CCA TAT TAT AGC	153
Asp Val Ala Ser Ala Arg Gly Val Ser Ser His Pro Pro Tyr Tyr Ser	
20 25 30	
AAA CCC ATT TGT TCA TCA CAG TCA TCG TTG ATT CGG ATT CCG ATC AGT	201
Lys Pro Ile Cys Ser Ser Gln Ser Ser Leu Ile Arg Ile Pro Ile Ser	
35 40 45	
AAA GGA TGT TGC TTT GCT CGT TCT TCG AAC TTG ATT ACT TCC CTT CAT	249
Lys Gly Cys Cys Phe Ala Arg Ser Ser Asn Leu Ile Thr Ser Leu His	
50 55 60	
GCT GCT TCG AGA GGG GTG ACA AGG CGT ACT AGT GGT GTA CAA TGG TGT	297
Ala Ala Ser Arg Gly Val Thr Arg Arg Thr Ser Gly Val Gln Trp Cys	
65 70 75 80	
TAC CGT TCT ATT AGA TTT GAC CCT TTC AAA GTT AAT GAT AAG AAC TCA	345
Tyr Arg Ser Ile Arg Phe Asp Pro Phe Lys Val Asn Asp Lys Asn Ser	
85 90 95	
AGA ACT GTG ACT GTG AGA TCG GAT CTT TCA GGA GCT GCA ACC CCT GAA	393
Arg Thr Val Thr Val Arg Ser Asp Leu Ser Gly Ala Ala Thr Pro Glu	
100 105 110	
TCT ACT TAT CCA GAA CCA GAG ATT AAG TTG AGC TCA AGA CTC AGA GGG	441
Ser Thr Tyr Pro Glu Pro Glu Ile Lys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Gly	
115 120 125	
ATA TGC TTC TGT CTC GTT GCT GGC ATC TCC GCC ATT GTT CTC ATC GTC	489
Ile Cys Phe Cys Leu Val Ala Gly Ile Ser Ala Ile Val Leu Ile Val	
130 135 140	
CTG ATG ATC ATT GGC CAT CCC TTC GTC CTT CTA TTT GAT CGT TAC AGG	537
Leu Met Ile Ile Gly His Pro Phe Val Leu Leu Phe Asp Arg Tyr Arg	
145 150 155 160	

AGA AAG TTC CAT CAC TTC ATT GCT AAG CTT TGG GCT TCC ATA AGC ATC Arg Lys Phe His His Phe Ile Ala Lys Leu Trp Ala Ser Ile Ser Ile 165 170 175	585
TAC CCG TTT TAC AAA ACA GAC ATC CAA GGT TTG GAG AAT CTG CCG TCG Tyr Pro Phe Tyr Lys Thr Asp Ile Gln Gly Leu Glu Asn Leu Pro Ser 180 185 190	633
TCA GAC ACT CCT TGT GTA TAC GTT TCG AAC CAC CAA AGC TTT CTG GAT Ser Asp Thr Pro Cys Val Tyr Val Ser Asn His Gln Ser Phe Leu Asp 195 200 205	681
ATA TAC ACA CTT CTC AGC CTT GGC CAA AGC TAT AAG TTC ATC AGC AAG Ile Tyr Thr Leu Leu Ser Leu Gly Gln Ser Tyr Lys Phe Ile Ser Lys 210 215 220	729
ACA GGG ATA TTC GTT ATT CCT GTC ATC GGT TGG GCT ATG TCC ATG ATG Thr Gly Ile Phe Val Ile Pro Val Ile Gly Trp Ala Met Ser Met Met 225 230 235 240	777
GGG GTT GTT CCC TTG AAG AGG ATG GAC CCA AGA AGC CAA GTG GAT TGC Gly Val Val Pro Leu Lys Arg Met Asp Pro Arg Ser Gln Val Asp Cys 245 250 255	825
TTA AAA CGC TGC ATG GAA CTA GTG AAG AAG GGA GCT TCC GTC TTT TTC Leu Lys Arg Cys Met Glu Leu Val Lys Lys Gly Ala Ser Val Phe Phe 260 265 270	873
TTC CCA GAG GGA ACG AGG AGT AAG GAT GGT CGG TTA GGT CCT TTC AAG Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Lys Asp Gly Arg Leu Gly Pro Phe Lys 275 280 285	921
AAA GGG GCT TTT ACG ATA GCA GCT AAG ACA GGA GTT CCA GTG GTG CCA Lys Gly Ala Phe Thr Ile Ala Ala Lys Thr Gly Val Pro Val Val Pro 290 295 300	969
ATA ACG CTG ATG GGA ACA GGG AAG ATC ATG CCG ACG GGT AGT GAA GGT Ile Thr Leu Met Gly Thr Gly Lys Ile Met Pro Thr Gly Ser Glu Gly 305 310 315 320	1017
ATA CTG AAT CAT GGG GAT GTG AGA GTG ATC ATC CAC AAG CCG ATA TAT Ile Leu Asn His Gly Asp Val Arg Val Ile Ile His Lys Pro Ile Tyr 325 330 335	1065
GGA AGC AAA GCT GAT GTT CTT TGC GAA GAG GCG AGA AAC AAG ATA GCT Gly Ser Lys Ala Asp Val Leu Cys Glu Glu Ala Arg Asn Lys Ile Ala 340 345 350	1113
GAA TCT ATG AAT CTC TTG AGT TGAAACGTTT GTTTTTTAAG CAGTGTCTCT Glu Ser Met Asn Leu Leu Ser 355	1164
ATGAACAATG AGAAGGCTAA ACCATTTTTA CATGTCAGTT TTATTGTTTA AAATAAAATT	1224
TAGGCTTTTC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1252

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 359 acides aminés
  - (B) TYPE: acide aminé
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Lys Ser His Gly Arg Cys Phe Ser Ser Arg Asp Ser Ala Met  
 1 5 10 15  
 Asp Val Ala Ser Ala Arg Gly Val Ser Ser His Pro Pro Tyr Tyr Ser  
 20 25 30  
 Lys Pro Ile Cys Ser Ser Gln Ser Ser Leu Ile Arg Ile Pro Ile Ser  
 35 40 45  
 Lys Gly Cys Cys Phe Ala Arg Ser Ser Asn Leu Ile Thr Ser Leu His  
 50 55 60  
 Ala Ala Ser Arg Gly Val Thr Arg Arg Thr Ser Gly Val Gln Trp Cys  
 65 70 75 80  
 Tyr Arg Ser Ile Arg Phe Asp Pro Phe Lys Val Asn Asp Lys Asn Ser  
 85 90 95  
 Arg Thr Val Thr Val Arg Ser Asp Leu Ser Gly Ala Ala Thr Pro Glu  
 100 105 110  
 Ser Thr Tyr Pro Glu Pro Glu Ile Lys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Gly  
 115 120 125  
 Ile Cys Phe Cys Leu Val Ala Gly Ile Ser Ala Ile Val Leu Ile Val  
 130 135 140  
 Leu Met Ile Ile Gly His Pro Phe Val Leu Leu Phe Asp Arg Tyr Arg  
 145 150 155 160  
 Arg Lys Phe His His Phe Ile Ala Lys Leu Trp Ala Ser Ile Ser Ile  
 165 170 175  
 Tyr Pro Phe Tyr Lys Thr Asp Ile Gln Gly Leu Glu Asn Leu Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Asp Thr Pro Cys Val Tyr Val Ser Asn His Gln Ser Phe Leu Asp  
 195 200 205  
 Ile Tyr Thr Leu Leu Ser Leu Gly Gln Ser Tyr Lys Phe Ile Ser Lys  
 210 215 220  
 Thr Gly Ile Phe Val Ile Pro Val Ile Gly Trp Ala Met Ser Met Met  
 225 230 235 240  
 Gly Val Val Pro Leu Lys Arg Met Asp Pro Arg Ser Gln Val Asp Cys  
 245 250 255  
 Leu Lys Arg Cys Met Glu Leu Val Lys Lys Gly Ala Ser Val Phe Phe  
 260 265 270  
 Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Lys Asp Gly Arg Leu Gly Pro Phe Lys  
 275 280 285  
 Lys Gly Ala Phe Thr Ile Ala Ala Lys Thr Gly Val Pro Val Val Pro  
 290 295 300  
 Ile Thr Leu Met Gly Thr Gly Lys Ile Met Pro Thr Gly Ser Glu Gly  
 305 310 315 320

Ile Leu Asn His Gly Asp Val Arg Val Ile Ile His Lys Pro Ile Tyr  
325 330 335

Gly Ser Lys Ala Asp Val Leu Cys Glu Glu Ala Arg Asn Lys Ile Ala  
340 345 350

Glu Ser Met Asn Leu Leu Ser  
355

## REVENDECATIONS

- 1) Fragment d'acide nucléique comprenant :
  - a) une séquence codant pour une LPAAT végétale dont la séquence peptidique présente au moins 20% d'identité avec la séquence SEQ ID NO: 2 ; et/ou
  - b) une séquence complémentaire de la séquence codante a) ci-dessus.
- 2) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence codante code pour le polypeptide de séquence SEQ ID NO: 2.
- 3) Fragment d'acide nucléique de plus de 20pb, capable de s'hybrider spécifiquement en conditions strictes avec une séquence codante telle que définie dans une quelconque des revendications 1 ou 2, à l'exception des fragments constitués par un oligonucléotide codant pour l'une des séquences peptidiques suivantes :
 

FPEGTRS ;

PFFKGA ;

ou par son complémentaire.
- 4) Vecteur recombinant contenant un fragment d'acide nucléique selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Cellule transformée par au moins un fragment d'acide nucléique selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 6) Cellule transformée selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule végétale.
- 7) Plante transgénique transformée par au moins un fragment d'acide nucléique selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 8) Utilisation d'un fragment d'acide nucléique selon une quelconque des revendications 1 à 3, pour réguler l'activité LPAAT chez une plante.
- 9) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite plante est le colza.

10) Utilisation selon une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisée en ce que ledit fragment d'acide nucléique est utilisé en orientation anti-sens.

5                    11) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit fragment d'acide nucléique est utilisé pour exprimer une LPAAT fonctionnelle.

10                   12) Utilisation selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite LPAAT est déletée de sa séquence d'adressage dans les plastes.